



**UNIwersytet Warszawski  
WYDZIAŁ BIOLOGII**

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA  
TEL: (+22) 55-41-104, FAX: (+22) 55-41-106

e-mail: [dziekan@biol.uw.edu.pl](mailto:dziekan@biol.uw.edu.pl)



Warszawa, 02.01.2018

Dr hab. Łukasz Dziewit  
Zakład Genetyki Bakterii  
Instytut Mikrobiologii  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski

02-01-2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr OLESII WERBOWY pt. „Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za stabilne dziedziczenie oraz rozprzestrzenianie plazmidów niosących systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu II”**

Rozprawa doktorska Pani Olesii Werbowy wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Tadeusza Kaczorowskiego w Katedrze Mikrobiologii, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego została przygotowana zgodnie z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, jak również rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Rozprawa doktorska Pani Werbowy składa się ze: (i) streszczenia w j. angielskim, (ii) streszczenia w j. polskim, (iii) trzech oryginalnych publikacji naukowych oraz (iv) oświadczeń Autorki i pozostałych współautorów publikacji. Publikacje naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w pismach: (i) *Plasmid* – praca Werbowy i wsp. 2015 (4 autorów, IF<sub>2015</sub> 1,732; punkty MNiSW 15) oraz (ii) *PLoS ONE* – praca Werbowy i Kaczorowski, 2016 oraz Werbowy i wsp. 2017 (odpowiednio 2 i 3 autorów; IF<sub>2016</sub> 2,806; punkty MNiSW 35). Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi więc wyodrębniona część prac zbiorowych (2-4 autorów), przy czym mgr Werbowy w swoich oświadczeniach jasno określiła swój wkład w powstanie powyższych prac, co zostało potwierdzone przez innych współautorów. Mgr Werbowy brała udział w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników prac oraz w przygotowaniu manuskryptów. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach, co dodatkowo potwierdza jej wiodący udział w prowadzonych pracach.

**OCENA PRACY**

Celem rozprawy doktorskiej mgr Werbowy było zbadanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za stabilne dziedziczenie oraz rozprzestrzenianie naturalnego plazmidu pEC156, niosącego system restrykcyjno-modyfikacyjny typu II.

Plazmidy, czyli pozachromosomowe, ruchome elementy genetyczne, występują powszechnie w bardzo wielu organizmach prokariotycznych. W plazmidach wyróżniono dwie podstawowe grupy modułów genetycznych. Pierwsza z nich skupia moduły genetyczne tworzące tzw. szkielet plazmidu, na który składają się: (i) moduły replikacyjne, (ii) moduły stabilizujące plazmidy w komórkach gospodarza oraz (iii) moduły odpowiedzialne za transfer

koniugacyjny. Do drugiej grupy modułów zaliczono elementy niosące tzw. dodatkową informację genetyczną, w tym moduły fenotypowe. Doktorantka, w swojej pracy skupiła się na analizie modułów podstawowych dla funkcjonowania plazmidu, czyli zaangażowanych w jego stabilne dziedziczenie oraz transfer koniugacyjny. Obiektem badań był niewielki (4,3 kb) kryptyczny plazmid pEC156 pochodzący z *Escherichia coli*. Plazmid ten niesie system restrykcyjno-modyfikacyjny typu II – EcoVIII.

Rozprawa doktorska mgr Werbowy zawiera krótkie streszczenie w j. angielskim i bardziej rozbudowane wprowadzenie w j. polskim. Oba rozdziały są zrozumiałe i napisane w dobrym stylu. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Werbowy tworzą spójny cykl charakteryzujący się oryginalnością i wysokim poziomem naukowym. Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest istotna dla dalszego rozwoju badań z zakresu biologii plazmidów bakteryjnych.

Oceniając aspekt metodologiczny prac mgr Werbowy należy zwrócić uwagę na: (i) prawidłowy i wyczerpujący (50, 73 i 83 pozycje literaturowe) dobór zacytowanej w publikacjach literatury naukowej, co świadczy o gruntownym zaznajomieniu się Doktorantki z literaturą przedmiotu; (ii) poprawność i klarowność formułowania pytań badawczych; (iii) interdyscyplinarność badań, (iv) trafność doboru metod i narzędzi badawczych oraz sumiennosc prowadzonych prac eksperymentalnych, jak również (v) przejrzystość treści publikacji, co znacznie ułatwia ich zrozumienie i prześledzenie toku myślenia autorów.

W moim mniemaniu najważniejsze osiągnięcia naukowe zaprezentowane w publikacjach wskazanych przez Doktorantkę to:

(i) w pracy Werbowy i wsp. 2015 (*Plasmid*) – wykazanie, że trzy główne czynniki mające wpływ na stabilne utrzymywanie plazmidu pEC156 w komórkach *E. coli* to: (i) obecność sekwencji *cer* odpowiedzialnej za rozdział multimetrów plazmidowych, (ii) obecność systemu restrykcyjno-modyfikującego typu II oraz (iii) relatywnie wysoka liczba kopii plazmidu pEC156. Równie istotne było wykazanie, że kluczowym elementem stabilizującym plazmid pEC156 jest sekwencja *cer*, a jej utrata powoduje destabilizację plazmidu w szerokim spektrum gospodarzy bakteryjnych.

(ii) w pracy Werbowy i Kaczorowski, 2016 (*PLoS ONE*) – wykazanie, że plazmid pEC156 posiada dwa *oriT* dzięki czemu może być mobilizowany do transferu koniugacyjnego przez różne plazmidy koniugacyjne oraz zaobserwowanie, że obecność systemu restrykcyjno-modyfikującego obniża częstość koniugacji i mobilizacji w przypadku gatunków bakterii innych niż gospodarz. Ponadto, w pracy wykazano, że plazmid pEC156 może być uwolniony do środowiska po śmierci komórki, przy czym może on zostać powtórnie pobrany przez *E. coli* w drodze transformacji.

(iii) w pracy Werbowy i wsp. 2017 (*PLoS ONE*) – stworzenie modelu teoretycznego (potwierzonego eksperymentalnie) umożliwiającego analizę stabilności plazmidów w populacji bakterii. Należy podkreślić, że zastosowane w pracy interdyscyplinarne podejście badawcze pozwoliło na sprzężenie charakterystyki molekularnej plazmidu z modelowaniem matematycznym.

#### PYTANIA I ZAGADNIENIA DO DYSKUSJI

Po przeczytaniu przedstawionej mi do recenzji pracy nasunęły mi się następujące pytania/zagadnienia do dyskusji, proszę więc Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich:

1. W jaki sposób oszacowano czasy generacji dla różnych *Enterobacteriaceae*? Wg danych zamieszczonych w publikacji Werbowy i wsp. 2015 czasy generacji dla różnych badanych enterobakterii były identyczne (12-13 generacji na 12 godzin).

2. Czy Doktorantka uważa, że podstawową rolą systemu restrykcyjno-modyfikującego EcoVIII jest stabilizacja plazmidu pEC156, czy raczej jest to jego dodatkowa, może nawet przypadkowa, funkcja biologiczna?

3. Jakie są i z czego wynikają ograniczenia zastosowania modelu teoretycznego (z pracy Werbowy i wsp. 2017) umożliwiającego analizę stabilności plazmidów w populacji bakterii?

4. Czy stwierdzenie zawarte w publikacji Werbowy i wsp. 2017, że multimeryzacja jest głównym czynnikiem wpływającym na stabilność plazmidów odnosi się wg Doktorantki jedynie do wysokokopiiowych plazmidów typu ColE1, czy też generalnie do wszystkich plazmidów?

5. W publikacji Werbowy i Kaczorowski, 2016 zaproponowano dwa mechanizmy uwalniania plazmidów do środowiska, tj. w wyniku zaburzenia równowagi restrykcja-metylacja, co w konsekwencji prowadzi do przypadkowego pocięcia DNA genomowego i śmierci komórki oraz w wyniku posegregacyjnego zabicia komórki, która utraciła plazmid z systemem restrykcyjno-modyfikacyjnym. Jak rozumiem drugi mechanizm nie ma zastosowania w przypadku plazmidu pEC156 (lub jego pochodnych  $r^+m^+$ ), bo zabijana komórka bezplazmidowa już utraciła ten plazmid, więc nie może go uwolnić do środowiska. Proszę o wyjaśnienie kiedy mechanizm posegregacyjnej eliminacji komórek bezplazmidowych w wyniku utraty plazmidu z systemem restrykcyjno-modyfikacyjnym może jednak powodować uwolnienie plazmidów do środowiska.

## WNIOSKI KOŃCOWE

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Stanowi też dowód szerokiej wiedzy teoretycznej Doktorantki w zakresie mikrobiologii oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia przez nią prac naukowych. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Olesii Werbowy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, udokumentowany ogromny wkład Doktorantki w przeprowadzone badania oraz fakt, że wyniki zostały już opublikowane w trzech oryginalnych artykułach naukowych wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy mgr Olesii Werbowy stosowną nagrodą.

Dr hab. Łukasz Dziewit